

Zentrum Hygiene und Humangenetik  
Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie  
Centre for Hygiene and Human Genetics  
Department of Cellular and Molecular Immunology



Die Entschlüsselung der molekularen Signalverschaltung in B-Lymphozyten ist fundamental für das Verständnis von Immunantworten und deren pathologischer Fehlfunktionen wie Allergie und Autoimmunität. Deciphering the molecular signal processes in B Lymphocytes is key to our understanding of immune responses and their pathological dysfunctions such as allergy and autoimmunity.

**Forschungsschwerpunkte** Research Foci

---

- ▷ Signalprozesse zur Aktivierung von B-Lymphozyten und Steuerung der humoralen Immunität
  - ▷ Molekulare Pathogenese entzündlicher, endokriner und maligner Erkrankungen
  - ▷ Regulation von chemotaktischen Leukozytenrezeptoren
  - ▷ Funktionelle Analyse des MHC und zelluläre Zytotoxizität
  - ▷ Effektormechanismen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität
- ▷ Signal Transduction Processes in B Lymphocytes and the Initiation of Humoral Immune Responses
  - ▷ Molecular Pathogenesis of Inflammatory, Endocrine and Malignant Diseases
  - ▷ Regulation of Chemotactic Leukocyte Receptors
  - ▷ Functional Analysis of the MHC and Cellular Cytotoxicity
  - ▷ Effector Mechanisms at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity
-



**Abteilungsdirektor** Head of Department

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Wienands

**Kontaktdaten** Contact

Abteilung Zelluläre & Molekulare Immunologie  
 UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN  
 Humboldtallee 34, D-37073 Göttingen  
 Telefon +49-551 / 39-5812, Fax +49-551 / 39-5843  
 rdoehne@gwdg.de; iteuteb1@gwdg.de  
 www.immunologie.uni-goettingen.de

**Hochschullehrer/innen** Professors and Lecturers

+49-551 /

Wienands, Jürgen	Prof. Dr. rer. nat.	jwienan@gwdg.de	39-5821
Reichardt, Holger	Prof. Dr. rer. nat.	hreichardt@med.uni-goettingen.de	39-3365
Oppermann, Martin	Apl. Prof. Dr. med.	mopperm@gwdg.de	39-5822
Dressel, Ralf	PD Dr. med.	rdresse@gwdg.de	39-5884
Schön, Margarete	PD Dr. biol. hum.	margarete.schoen@med.uni-goettingen.de	39-6082
Soruri, Afsaneh	PD Dr. rer. nat.	asoruri@gwdg.de	
Zwirner, Jörg	Apl. Prof. Dr. med.	jzwirne@gwdg.de	

**Weitere Arbeitsgruppenleiter/innen** Other Group Leaders

Engelke, Michael	Dr. rer. nat.	mengelk@gwdg.de	39-13858
Engels, Niklas	Dr. rer. nat.	nengels@gwdg.de	39-13858
van den Brandt, Jens	Dr. rer. nat.	jbrandt@med.uni-goettingen.de	39-22027
Thiel, Cora	Dr. rer. nat.	cthiel2@gwdg.de	

## 1. Signalprozesse zur Aktivierung von B-Lymphozyten und Steuerung der humoralen Immunität

Die Initiation der Antikörper-vermittelten Immunantwort (humorale Immunität) erfolgt über die Stimulation des B-Zell-Antigenrezeptors (BCR). Hauptziel unserer Forschungsaktivitäten ist das molekulare Verständnis BCR-gesteuerter Signalprozesse, die zur Differenzierung der B-Zelle und zur Sekretion von Antikörpern führen. Defekte in diesen Mechanismen verursachen Immundefizienzen, z.B. den Morbus Bruton (XLA-Krankheit), und sind an der Ausbildung von B-Zell-Tumoren beteiligt.

### **Kontrolle der Aktivierung von B-Lymphozyten durch intrazelluläre Adapterproteine**

Die Antigen-vermittelte Stimulation des BCR führt zur Aktivierung von zytoplasmatischen Protein-Tyrosin-Kinasen wie *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) oder *Bruton's Tyrosine Kinase* (Btk). Ein zentrales Substrat- und Effektorprotein dieser Kinasen ist die Phospholipase  $C\gamma 2$ , die die Bereitstellung von  $Ca^{2+}$ -Ionen als „Second Messenger“ steuert. Wir konnten zeigen, dass der strukturelle und funktionelle Aufbau dieser Signalkaskade über das von uns identifizierte Adapter- oder Gerüstprotein SLP-65 organisiert wird. Defekte in der Expression oder Funktion von SLP-65 blockieren die Entwicklung von B-Zellen und führen zu einem Ausfall der humoralen Immunantwort. SLP-65 ist aber auch ein Tumor-Suppressor-Protein, das bei fehlender Expression in Menschen und Mäusen zu prä-B-Zell-Leukämien und B-Zell-Lymphomen führt. Unser zentrales Ziel ist daher die Aufklärung der genauen Funktionsweise von SLP-65 bei der Aktivierung und apoptotischen Eliminierung von B-Zellen.

### **Differenzielle Regulation der $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in aktivierten B-Lymphozyten**

Bevor B-Lymphozyten Antikörper produzieren, durchlaufen sie eine Reihe von Entwicklungs- und Differenzierungsschritten, die durch Signale des BCR kontrolliert werden. BCR-Signale werden im Verlauf der B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung angepasst. So zeigen z.B. unreife B-Zellen, die im Kontext der immunologischen Toleranz nach Antigenerkennung Apoptose durchlaufen, eine transiente BCR-induzierte  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung. Für reife B-Zellen hingegen, die Antigen-induziert proliferieren und differenzieren, ist ein stärkeres und länger anhaltendes  $Ca^{2+}$ -Signal charakteristisch.

Im Fokus unserer Arbeit steht die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, die BCR-vermittelte Signale differenziell regulieren. Wir konnten ein Signalmodul identifizieren und charakterisieren, das BCR-vermittelte Signale kontrolliert. Wir zeigten, dass die Adapterproteine *Growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) und *Downstream of kinase-3* (Dok-3) die  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in unreifen B-Zellen begrenzen. In reifen B-Zellen kann der Funktion des Grb2/Dok-3-Moduls durch das transmembranständige Adapterprotein *Non-T cell activation linker* (NTAL) entgegengewirkt werden. Dies ist ein Beispiel, wie Grb2-vermittelte Proteinkomplexe antigeninduzierte Signale in B-Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien regulieren.

In einem weiteren Schwerpunkt untersuchen wir die Aktivierung und Funktion der *SH2 domain-containing inositol phosphatase* (SHIP). SHIP verändert die Zusammensetzung von Phosphoinositiden (PIPs) auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran und determiniert auf diese Weise die Aktivierungsschwelle von B-Lymphozyten, um die Produktion autoreaktiver Antikörper zu vermeiden. Wir haben zahlreiche, bislang nicht bekannte SHIP-Bindepartner identifiziert und konnten zeigen, auf welche Weise diese Proteine die Funktion von SHIP beeinflussen. Wir haben dazu auch bildgebende Verfahren entwickelt, um die Kinetik und Dynamik dieses Signalprozesses zu untersuchen.

### **Signalprozesse zur Etablierung und Aktivierung der humoralen Immunität**

Die Antigen-vermittelte Stimulation des BCR führt zur Aktivierung von zytoplasmatischen Protein-Tyrosin-Kinasen, die wiederum nachgeschaltete Effektorproteine wie z.B. die Phospholipase  $C\gamma 2$  aktivieren. Dadurch kommt es im Zellinneren zur Produktion der sekundären Botenstoffe Diacylglycerol und Inositoltrisphosphat sowie zu einer transienten Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration. Diese Signalmechanismen werden in B-Zellen aller Differenzierungsstadien ausgelöst. Wir konnten jedoch erstmalig zeigen, dass der BCR auf Gedächtnis-B-Zellen diese Signalkaskade durch die direkte Assoziation mit dem Adapterprotein Grb2 stark amplifiziert. Dies könnte zum einen die Aktivierungsschwelle von Gedächtnis-B-Zellen herabsetzen und zum anderen einen Überlebensvorteil für Gedächtnis-B-Zellen gegenüber naiven B-Zellen ausmachen. Gegenwärtig untersuchen wir sowohl die molekularen Mechanismen der BCR-Signalkaskade in Gedächtnis-B-Zellen sowie deren Funktion für die Biologie dieser Zellen *in vivo*. Langfristig werden unsere Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis des immunologischen Gedächtnisses sowie der Entstehung von allergischen Reaktionen beitragen.

### **Protein- und Vesikeltransport durch das intrazelluläre Adapterprotein mAbp1**

Intrazelluläre Transportprozesse, wie die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Antigenen, spielen eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen. In Nervenzellen sind endo- und exozytotische Vorgänge zentral an der Bereitstellung und Wiedergewinnung von Neurotransmittern beteiligt. Mit dem zytoplasmatischen Adapterprotein mAbp1 (*mammalian actin-binding protein 1*) haben wir ein neues Schaltelement dieser Mechanismen identifiziert. Die Analyse unserer mAbp1-defizienten Maus belegt eine Schlüsselstellung von mAbp1 bei der Bereitstellung von Neurotransmittern in hippocampalen Neuronen (Zusammenarbeit mit Dr. J. Klingauf, MPI für Biophysikalische Chemie). Der mAbp1-Defekt führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Bewegungskoordination und der neuromotorischen Fähigkeiten der Mausmutanten. Darüber hinaus zeigen diese Tiere weitere Organdefekte, z.B. in der Lunge, im Herzen und in der Milz. Dies deutet daraufhin, dass mAbp1-vermittelte Prozesse für die Integrität vieler Organsysteme notwendig sind. Unsere mAbp1-defiziente Maus kann darüber hinaus als Modellsystem für neurologische und kardiologische Erkrankungen dienen.

## 1. Signal Transduction Processes in B Lymphocytes and the Initiation of Humoral Immune Responses

Antibody-mediated immune responses (Humoral Immunity) are triggered upon activation of the B cell antigen receptor (BCR). The main objective of our research is the molecular understanding of BCR-controlled signalling cascades, which trigger differentiation of B cells and lead to the secretion of soluble antibody molecules. Signalling deficits are well known to cause immunodeficiencies, such as Morbus Bruton (XLA-disease), and also have an implication on the generation of B cell-derived tumours.

### *Positive and negative signalling by the intracellular adaptor protein SLP-65*

BCR ligation activates cytoplasmic protein tyrosine kinases such as *Spleen tyrosine kinase* (Syk) or *Bruton's tyrosine kinase* (Btk). A critical substrate of these kinases and a central BCR effector protein is phospholipase C $\gamma$ 2, which triggers mobilization of the second messenger Ca<sup>2+</sup>. We have shown that this BCR signalling cascade is structurally and functionally organized by the adaptor or scaffold protein SLP-65. Defective SLP-65 expression or function blocks B cell development and prevents the initiation of humoral immune responses. However, SLP-65 also possesses tumour suppressor activity. Hence, in the absence of SLP-65, affected individuals are prone to develop pre-B cell leukaemia and B cell lymphomas. We thus aim at elucidating the exact signalling mechanisms of SLP-65, which are instrumental for proper activation and apoptotic elimination of B cells.

### *Differential Regulation of Ca<sup>2+</sup> Mobilization in Activated B Lymphocytes*

The generation of antibody-producing B lymphocytes is preceded by several developmental steps that are controlled by the BCR. BCR signals are adjusted in the course of B cell development and differentiation. For example, immature B cells that undergo apoptosis after antigen recognition in the context of immunological tolerance show transient BCR-induced Ca<sup>2+</sup> signals. Mature B cells, however, proliferate and differentiate upon antigen stimulation and show a robust and sustained Ca<sup>2+</sup> signal.

The aim of our work is to decipher Ca<sup>2+</sup>-regulating pathways on a molecular level. We identified and characterized the adapter proteins *growth factor receptor bound protein 2* (Grb2) and *downstream of kinase-3* (Dok-3) as regulators of Ca<sup>2+</sup> mobilization in immature B cells. In mature B cells the function of Grb2/Dok-3 is counteracted by the transmembrane adapter protein non-T cell activation linker (NTAL). This is one example how Grb2-mediated protein complexes control differential BCR-induced signals.

Another project aims at understanding the activation and function of the *SH2 domain-containing inositol phosphatase* (SHIP). SHIP alters the composition of phosphoinositides at the inner leaflet of the plasma membrane and determines the threshold of B cell activation, which is important to prevent production of autoantibodies. We identified a number of yet unknown SHIP binding partners and

could show how these proteins are involved in SHIP function. To examine the kinetics and dynamics of this process we established live imaging techniques.

### *Signal transduction mechanisms for establishment and maintenance of humoral immunity*

Stimulation of the BCR induces activation of cytosolic protein tyrosine kinases that activate downstream effector enzymes such as phospholipase C $\gamma$ 2. This causes the production of the second messengers diacylglycerol and inositoltrisphosphate and a subsequent transient rise in the intracellular concentration of Ca<sup>2+</sup> ions. These signal transduction pathways are initiated in all B cells irrespective of their differentiation stage. However, in memory B cells these signaling mechanisms are greatly enhanced by means of direct association of the adaptor protein Grb2 with the BCR. This mechanism might on the one hand lower the activation threshold of antigen-experienced memory B cells and on the other hand provide naive B cells with a survival advantage. Currently, we are analyzing the molecular details of the BCR cascade in memory cells as well as its role in the biology of memory B cells *in vivo*. In the long run our findings will provide a better understanding of immunological memory as well as the onset of allergic reactions.

### *Intracellular vesicle transport by the mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1) in immune and nerve cells*

Intracellular transport processes, such as receptor-mediated endocytosis of antigens, are instrumental in efficiently activating immune cells. In neuronal cells, endo- and exocytosis of membrane vesicles control the release and recycling of neurotransmitters. We have identified the cytoplasmic adapter protein mAbp1 as a novel regulator of the endo-/exocytic machinery. Analysis of our mAbp1-deficient mouse reveals that mAbp1 plays a non-redundant role in recycling of synaptic vesicles and neurotransmitter supply. The presynaptic defect of mAbp1 mouse mutants is associated with impaired physical capabilities and severely disturbed neuromotoric behaviour. Moreover, mAbp1 knock-out mice mutants show an abnormal structure of lung, heart, and spleen indicating that mAbp1-mediated processes are mandatory for the integrity of multiple organ systems. Our mAbp1-deficient mouse may serve as a model system for neurological and cardiological diseases.

### **Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders**

Prof. Dr. Jürgen Wienands

Dr. Michael Engelke

Dr. Niklas Engels

Dr. Cora Thiel

### **Kooperationen Cooperations**

F. Batista, London Research Institute, London

M. Bösl, MPI für Neurobiologie, Martinsried

E. Hobeika, MPI für Immunbiologie, Freiburg

H.-M. Jäck, Abt. Molekulare Immunologie, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen Nürnberg

J. Klingauf, Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen

D. Kube, B. Glass, Abt. Hämatologie und Onkologie, Universitätsmedizin Universität Göttingen  
T. Kurosaki, RIKEN-Institut, Yokohama, Japan  
M. Müschen, Abt. für Molekulare Stammzellbiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
M. Naumann, Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg  
M. Reth, Abt. für Molekulare Immunologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
O. Rocks, Mount Sinai Hospital, Toronto  
B. Schraven, Institut für Immunologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg  
T. Tsubata, Medical and Dental University, Tokio, Japan  
H. Urlaub, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen  
E. Vigorito, Babraham Institute, Cambridge, UK

#### Drittmittelförderung Funding

DFG, Forschergruppe, WI 1704/1-3, 2007-2009

DFG, Forschergruppe, WI 1704/3-1, 2007-2009

DFG, SFB 523 (TP B14), 2006-2008

DFG, AY 8/1-2, 2005-2006

DFG, Forschergruppe, WI 1704/1-2, 2005-2007

DFG, Forschergruppe, WI 1704/1-1, 2005-2007

EU, HEALTH-F2-2008-201549 EURO-PADnet, 2008-2011

EU, 012919 (NEST)HYBLIB, 2005-2009

Nieders. Vorab der VolkswagenStiftung, Niedersächsisch-Israelische Gemeinschaftsvorhaben, 2008-2011

#### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Connert S, Wienand S, Thiel C, Krikunova M, Glyvuk N, Tsytsyura Y, Hilfiker-Kleiner D, Bartsch JW, Klingauf J, Wienands J (2006) SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioural abnormalities and impaired vesicle transport. *EMBO J*, 25(8): 1611-22.

Grabbe A, Wienands J (2006) Human SLP-65 isoforms contribute differently to activation and apoptosis of B lymphocytes. *BLOOD*, 108(12): 3761-68.

Abudula A, Grabbe A, Brechmann M, Polaschegg C, Herrmann N, Goldbeck I, Dittmann K, Wienands J (2007) SLP-65 signal transduction requires Src homology 2 domain-mediated membrane anchoring and a kinase-independent adaptor function of Syk. *J BIOL CHEM*, 282(39): 29059-66.

Stork B, Neumann K, Goldbeck I, Alers S, Kähne T, Naumann M, Engelke M, Wienands J (2007) Subcellular localization of Grb2 by the adaptor protein Dok-3 restricts the intensity of Ca<sup>2+</sup> signaling in B cells. *Embo J*, 26: 1140-49.

Engelke M, Engels N, Dittmann K, Stork B, Wienands J (2007) Ca<sup>2+</sup> signaling in antigen receptor-activated B lymphocytes. *Immunol Rev*, 218: 235-46.

Engels N, Engelke M, Wienands J (2008) Conformational plasticity and navigation of signaling proteins in antigen-activated B lymphocytes. *Adv Immunol*, 97: 251-81.

## 2. Molekulare Pathogenese entzündlicher, endokriner und maligner Erkrankungen

Im Verlauf des vorliegenden Berichtzeitraumes erfolgte die Erweiterung der Abteilung um eine neue Arbeitsgruppe. Prof. Dr. Holger Reichardt, bislang an der Universität Würzburg tätig, wurde zum 1. Januar 2007 an die Universitätsmedizin Göttingen berufen. Hauptaufgabe im Laufe des ersten Jahres war der Umzug der bestehenden Arbeitsgruppe, deren sukzessive Erweiterung sowie die Etablierung von Kooperationen mit Kollegen aus den Abteilungen für Neuroimmunologie (IMSF), Neuropathologie, Hämatologie, Humangenetik und Molekulare Onkologie. In Fortführung der langjährigen Forschungstradition konzentrierte sich das breit gefächerte Interesse der Arbeitsgruppe auch in Göttingen auf den Schnittpunkt zwischen Immunologie und deren Nachbardisziplinen Endokrinologie, Neurologie und Hämatologie. Die Förderung

der Projekte erfolgte durch verschiedene private Stiftungen, die DFG, das BMBF sowie die Industrie.

Chronische Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Diabetes, Asthma und Krebs verursachen weltweit dramatische Gesundheitsprobleme, erfordern häufig lebenslange medizinische Behandlung und führen unter Umständen zu Behinderung und frühem Tod. Viele der aktuell verfügbaren Therapien sind unbefriedigend und von teils schweren Nebenwirkungen begleitet. Daher ist unser Ziel, die Pathogenese dieser Erkrankungen sowie den Mechanismus konventioneller und neuer Behandlungsstrategien besser zu verstehen. Im Mittelpunkt unseres Interesses stehen insbesondere Glukokortikoide als Standardtherapie von entzündlichen Erkrankungen und Lymphomen. Darüber hinaus arbeiten wir an neuen Pharmaka sowie der Modulation des Immunsystems durch monoklonale Antikörper. Weitere Arbeitsgebiete betreffen grundlegende Fragen zur Entwicklung und Funktion von Lymphozyten, die Rolle von Notch1 im Rahmen der Tumorgenese sowie endokrine Regulationsmechanismen. Zur Erreichung unserer Ziele nutzen wir eine Vielzahl experimenteller Ansätze, von biochemischen und molekularbiologischen Methoden über Zellkultursysteme bis hin zu Tiermodellen. Spezielle Expertisen unseres Labors umfassen die Nutzung lentiviraler Vektoren zur Geninaktivierung mittels RNAi und die Herstellung von transgenen, knockout und knockdown Mäusen und Ratten.

#### Modulation des Immunsystems durch Glukokortikoide

Durch Generierung und Analyse verschiedener genetisch veränderter Tiermodelle konnten wir Erkenntnisse zur Regulation von T-Zellen und Makrophagen im Kontext entzündlicher Erkrankungen gewinnen. Eine verstärkte Glukokortikoid-Wirkung, wie sie beispielweise bei chronischem Stress auftritt, hat im Tiermodell einen milderen Verlauf von Multipler Sklerose zur Folge; Asthma hingegen verschlimmert sich eher. In anderen Tiermodellen konnten wir nachweisen, dass T-Zellen für eine Behandlung von Multipler Sklerose mit hochdosierten Glukokortikoiden von zentraler Bedeutung sind. Die Therapie von Kontaktdermatitis mittels topischer Glukokortikoide wirkt hingegen hauptsächlich auf Granulozyten und Makrophagen. Dies belegt, dass bei Stress freigesetzte Glukokortikoide und pharmakologisch verabreichte Präparate, wie sie bei ca. 3 % der Bevölkerung zur Anwendung kommen, abhängig von der jeweiligen Krankheit sehr unterschiedliche Wirkungen aufweisen können.

#### Mechanismus CD28 superagonistischer Antikörper

Zur Untersuchung der Wirkungsweise dieser neu entwickelten Klasse therapeutischer Antikörper wurden verschiedene Tiermodelle eingesetzt. Eine Behandlung von Multipler Sklerose und Typ I Diabetes bei Ratten erwies sich als äußerst wirkungsvoll, wobei der Therapieerfolg unter anderem der Aktivierung regulatorischer T-Zellen zugeschrieben werden konnte. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es nach Applikation des Antikörpers zu einer dramatisch verminderten Beweglichkeit der T-Zellen kommt und diese aus den peripheren Organen und dem Blut verschwinden. Die Folge ist eine Lymphopenie wie sie in ähnlicher Weise in einer Phase I Studie mit dem Antikörper TGN1412 beim Menschen beobachtet wurde.

Im Rattenmodell kommt es jedoch nicht zu der dort beobachteten übermäßigen Freisetzung von Zytokinen und den damit verbundenen verheerenden Folgen.

#### ***Endokrine Dysregulation bei Diabetes mellitus und Pseudohypoaldosteronismus***

Die hormonelle Kontrolle des Salzwasser-Haushaltes sowie des Blutzuckerspiegels wird durch die Hormone Aldosteron und Insulin vermittelt. Durch Entwicklung neuartiger Techniken zur gezielten Geninaktivierung konnten Erkenntnisse zur endokrinen Homöostase erhalten werden. Bei reduzierter Aldosteron-Wirkung über den Mineralokortikoid-Rezeptor kommt es zu einer verminderten Natrium-Rückresorption in der Niere, während der Verlust des Insulin-Rezeptors die Entwicklung eines Typ II Diabetes mellitus zur Folge hat. Aufgrund der besonderen Eigenschaften des neuartigen Systems kann die Geninaktivierung des Insulin-Rezeptors und damit die Hyperglykämie rückgängig gemacht werden. Dies wird es in Zukunft ermöglichen, die langfristigen Folgen von Diabetes besser zu verstehen.

#### ***Notch1 und die Lymphomgenese***

Tierexperimentelle Studien aus unserer sowie anderen Arbeitsgruppen zeigen, dass eine konstitutive Überexpression von Notch1 in T-Zellen zur Entwicklung von akuten T-lymphoblastischen Lymphomen (T-ALL) führt. In Kooperation mit Bernd Dörken von der Charité Berlin konnten wir nun auch einen Zusammenhang zwischen Notch1, der hierdurch bedingten Transdifferenzierung von B-Zellen und der Entstehung des Hodgkin Lymphoms herstellen. Dies belegt, dass Notch1 nicht nur bei T-Zell-Malignitäten, sondern auch bei Neoplasien der B-Zell-Reihe eine wichtige Rolle spielt.

## **2. Molecular Pathogenesis of Inflammatory, Endocrine and Malignant Diseases**

In the course of the last reporting period, an additional research group has complemented the department. Prof. Dr. Holger Reichardt, formerly working at the University of Würzburg, had been appointed with effect from January 2007 to a professorship at the University of Göttingen Medical School. The main task in the first year was the relocation of the existing research group, its successive expansion and the establishment of cooperations with colleagues from the Departments of Neuroimmunology (IMSF), Neuropathology, Hematology, Human Genetics and Molecular Oncology. In continuation of the long-lasting research tradition the broad interests of the group concentrated on the intersection between immunology and its neighbouring disciplines endocrinology, neurology and hematology. Support of the projects was provided by various private trusts, the DFG, the BMBF, and industry.

Chronic diseases such as multiple sclerosis, diabetes, asthma and cancer are major worldwide health problems, often require lifetime medical treatment and may result in permanent disability and early death. Generally, therapy is unsatisfactory and accom-

panied by partially severe side effects. Therefore our work aims at better understanding the pathogenesis of such diseases as well as the mechanisms underlying conventional as well as new treatment regimens. Those include above all glucocorticoids as the mainstay of many therapies to treat inflammatory disorders and lymphomas. Further interests concern novel pharmaceutical compounds as well as monoclonal antibodies designed to modulate the immune system. Additional research areas include basic questions related to the development and function of lymphocytes, the role of Notch1 in tumorigenesis and endocrine control mechanisms. To accomplish our goals we use a plethora of experimental approaches, from biochemistry and molecular biology to cell culture systems and animal models. Special expertises of our group concern the use of lentiviral vectors to achieve gene inactivation by RNAi and the generation of transgenic, knockout and knockdown mice and rats.

#### ***Modulation of the immune system by glucocorticoids***

The generation and analysis of different genetically modified animal models allowed us to obtain insight into the regulation of T cells and macrophages in the context of inflammatory diseases. Increased glucocorticoid action such as during chronic stress results in a milder disease course in an animal model of multiple sclerosis. In contrast, experimentally induced asthma rather aggravates. Using other animal models we could demonstrate that T cells are central to high-dose glucocorticoid therapy of multiple sclerosis while treatment of contact dermatitis by topical glucocorticoids primarily targets granulocytes and macrophages. This highlights that glucocorticoids released during stress and pharmacological preparations prescribed to about 3% of the population may have quite distinct effects depending on the individual disease.

#### ***Mechanism of CD28 superagonistic antibodies***

Several animal models were employed to study the mode of action of this newly developed class of therapeutic antibodies. Treatment of multiple sclerosis and type I diabetes in rat models was exceptionally efficient whilst the beneficial effects could in part be ascribed to the activation of regulatory T cells. Further investigations revealed that the motility of T lymphocytes was dramatically diminished after antibody application and that these cells disappeared from peripheral organs and the blood. This results in the development of lymphopenia similar to the clinical phase I trial of the antibody TGN1412 in human volunteers. Nevertheless, the excessive release of cytokines observed in humans in conjunction with its devastating outcome did not occur in the rat model.

#### ***Endocrine dysregulation in diabetes mellitus and pseudohypoaldosteronism***

Salt-water-balance and the blood glucose level are controlled by the hormones aldosterone and insulin. The development of a novel technique for targeted gene inactivation provided insight into endocrine homeostasis. Reduced aldosterone action mediated by the mineralocorticoid receptor leads to diminished sodium reabsorption in the kidney and loss of the insulin receptor results in the development of type II diabetes. Due to the exceptional characteris-

tics of the new system gene inactivation of the insulin receptor and hyperglycemia can be reversed. In the future this will allow a better understanding of the longterm consequences of diabetes.

### Notch1 and lymphomagenesis

Animal experiments performed in our and other groups revealed that constitutive expression of Notch1 in T cells induces acute T-lymphoblastic lymphomas (T-ALL). In cooperation with Bernd Dörken (Charité Berlin) we could now also demonstrate a link between Notch1, the transdifferentiation of B-cells and the development of Hodgkin lymphoma. This confirms that Notch1, besides being involved in T cell malignancies, also plays an important role in B cell neoplasias.

### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

Prof. Dr. Holger M. Reichardt

Dr. Jens van den Brandt

### Kooperationen Cooperations

J. Tuckermann, Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena

M. Fassnacht, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universität Würzburg

G. Schütz, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

B. Dörken, Charité-Universitätsmedizin Berlin

R. Gold, Neurologische Klinik, Universität Bochum

A. Flügel, Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried

A. Villunger, Universität Innsbruck, Österreich

D. Furlow, University of California Davis, USA

J. Taurog, University of Dallas, USA

A. Louw, University of Stellenbosch, Südafrika

### Drittmittelförderung Funding

DFG, RE 1631/1-3, 2007-2009

DFG, Klinische Forschergruppe KFO124

Gemeinnützige Hertie-Stiftung, 1.01./06/010

Wilhelm Sander-Stiftung, 2003.129.2

BMBF und TaconicArtemis GmbH, Köln

OMT Inc., Palo Alto, USA

### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

van den Brandt J, Lühder F, KG, de Graaf KL, Tischner D, Wiehr S, Herrmann T, Weissert R, Gold R, Reichardt HM (2007) Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *Am J Pathol*, 170: 1041-53.

Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggi R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen BE, Stride B, Förster I, Habenicht AJ, Reichardt HM, Tronche F, Schmid W, Schütz G (2007) Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest*, 117: 1381-90.

Lim HY, van den Brandt J, Fassnacht M, Allolio B, Herold M, Reichardt HM (2008) Silencing of the mineralocorticoid receptor by RNA interference in transgenic rats disrupts endocrine homeostasis. *Mol Endocrinol*, 22: 1304-11.

Wüst S, van den Brandt J, Tischner D, Kleiman A, Tuckermann JP, Gold R, Lühder F, Reichardt HM (2008) Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 180: 8434-43.

Müller N, van den Brandt J, Odoardi F, Tischner D, Herath J, Flügel A, Reichardt HM (2008) A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J Clin Invest*, 118: 1405-16.

Jundt F, Acikgöz Ö, Kwon SH, Schwarzer R, Anagnostopoulos I, Wiesner B, Mathas S, Hummel M, Stein H, Reichardt HM, Dörken B (2008) Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, 22: 1587-94.

Herold MJ, van den Brandt J, Seibler J, Reichardt HM (2008) Inducible and reversible gene silencing by stable integration of an shRNA-encoding lentivirus in transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 18507-512.

## 3.

### Regulation von chemotaktischen Leukozytenrezeptoren

Die chemotaktischen Leukozytenrezeptoren CCR5 und C5aR sind G Protein-gekoppelte Rezeptoren mit wichtigen Funktionen im angeborenen und adaptiven Immunsystem. CCR5 fungiert darüber hinaus als essentieller Co-Rezeptor für HIV-1/-2. Beide Rezeptoren dienen als Modell-Rezeptoren für die Untersuchung von Signaltransduktion und Oberflächenregulation chemotaktischer Leukozytenrezeptoren. Aufbauend auf eigenen Untersuchungen zur Phosphorylierung von chemotaktischen Rezeptoren durch Rezeptorkinasen konnten wir u.a. mittels phosphospezifischer mAk nachweisen, dass der Phosphorylierungsstatus einer funktionell relevanten Akzeptorstelle auf C5aR durch PKC- $\beta$ I/II im Zusammenwirken mit einer Calyculin A-sensitiven Protein Phosphatase reguliert wird. Das Adaptorprotein  $\beta$ -Arrestin bindet Phosphorylierungs-abhängig an C5aR, moduliert aber zugleich über einen neu identifizierten Rückkopplungsmechanismus die PKC-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors. In Zusammenarbeit mit einer anderen Arbeitsgruppe identifizierten wir hydrophobe Aminosäuren im Bereich des C5aR Carboxyterminus, die für eine intakte Phosphorylierung, Endozytose sowie den anterograden Transport des Rezeptors von Bedeutung sind.

Neben den pro-inflammatorischen Peptiden des Komplementsystems und seinen Rezeptoren (C5aR) beziehen sich weitere Arbeiten auf das Komplement-Kontrollprotein Faktor H (CFH). In Zusammenarbeit mit P. Zipfel (Jena) wurden funktionell relevante Epitope auf CFH identifiziert. Diese Ergebnisse legen ein alternatives Modell der Konformation von CFH nahe, demzufolge dieses Protein nach Bindung an (körpereigene) Oberflächen eine Konformationsänderung vollzieht, wobei sekundäre Bindungsstellen exponiert werden. Diese Arbeiten haben möglicherweise Bedeutung für das Verständnis des hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) sowie der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). Bei letzterer Erkrankung konnten wir erstmals den Nachweis auch systemisch erhöhten Komplementumsatzes im Plasma von AMD-Patienten führen. Zugleich korrelierte das Ausmaß der Komplementaktivierung mit dem Vorliegen von Risiko- bzw. protektiven Varianten des Kontrollproteins CFH bei AMD-Patienten. Diese Befunde stützen die Hypothese, derzufolge eine polymorphe Variation von CFH über eine mehr oder weniger strikte Regulation der lokalen Komplementaktivierung in der Retina zu den dort beobachteten Läsionen beitragen könnte.

## 3.

### Regulation of Chemotactic Leukocyte Receptors

The chemotactic leukocyte receptors CCR5 and C5aR belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCR) and fulfill important functions in innate and adaptive immunity. CCR5 is also an essential co-receptor for HIV-1/-2. Both proteins serve as model receptors for studies on signal transduction and the regulation of cell surface expression of chemotactic leukocyte receptors. Based on earlier work on the ligand-induced phosphorylation of these receptors by

receptor kinases we showed, using phosphosite-specific mAb, that the phosphorylation state of a functionally relevant acceptor site on C5aR is regulated by protein kinase C (PKC- $\beta$ /II) together with a protein phosphatase which is sensitive to calyculin A. The adaptor protein  $\beta$ -arrestin binds to C5aR in a phosphorylation-dependent manner and, at the same time, modulates PKC-mediated phosphorylation of C5aR through a novel feedback mechanism. Together with colleagues from other groups we identified hydrophobic amino acid residues in the C5aR carboxyl terminus, which are relevant for intact phosphorylation, endocytosis and the anterograde transport of this receptor.

Besides pro-inflammatory peptides of the complement system and its receptors (C5aR) we are also interested in control proteins of the complement system, notably complement factor H (CFH). Together with P. Zipfel (Jena) we identified functionally relevant epitopes on CFH. These results suggest an alternative structural model for CFH according to which this protein undergoes a conformational change upon initial contact to (cell) surfaces. This leads to exposure of secondary binding sites on CFH. These results are potentially relevant for understanding the pathophysiology of the hemolytic-uremic syndrome (aHUS) and age-related macular degeneration. Our work provided evidence for enhanced turnover of the complement system in plasma of AMD patients and these findings further correlated with the presence or absence of either protective or risk variants of the complement control protein CFH in AMD patients. These results support the hypothesis of a role for polymorphic variation of CFH through more or less strict control of local complement activation in the generation of retinal lesions which are a hallmark of this disease.

#### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

Prof. Dr. Martin Oppermann

#### Kooperationen Cooperations

H. Miettinen, Montana State University, Bozeman/MT, USA

H.P. Scholl, Universitätsaugenklinik Bonn

P. Zipfel, Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena

A. Edwards, Mayo Clinic, Rochester/MN, USA.

#### Drittmittelförderung Funding

DFG, Sonderforschungsbereich 523 (TP A10), seit 1999

DFG, Sonderforschungsbereich 402 (TP B7), 2001-2006

#### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Oppermann M, Manuélian T, Józsi M, Brandt E, Jokiranta TS, Heinen S, Meri S, Skerka C, Götze O, Zipfel PF (2006) The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. CLIN EXP IMMUNOL, 144: 342-52.

Pollok-Kopp B, Hüttenrauch F, Rethorn S, Oppermann M. (2007) Dynamics of protein kinase C mediated phosphorylation of the C5a receptor on serine-334. J BIOL CHEM, 282: 4345-53.

Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M (2008) Systemic complement activation in age-related macular degeneration. PLoS ONE, 3(7): e2593.

## 4.

### Funktionelle Analyse des MHC und zelluläre Zytotoxizität

Die Arbeitsgruppe Dressel befasst sich mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) und der Funktion bestimmter in diesem Komplex gelegener Gene. Es werden dabei vor allem tumorimmunologische und transplantationsimmunologische Fragestellungen bearbeitet. Die Funktion und Bedeutung zytotoxischer Zellen steht im Mittelpunkt des Interesses.

Der MHC-Genkomplex übt eine zentrale Funktion bei der Entwicklung des Immunsystems und dem Zustandekommen einer Immunantwort aus. So kontrolliert er über die so genannten Klasse-I- und Klasse-II-Gene die antigenspezifische, adaptive Immunantwort, nimmt aber über bestimmte Gene auch Einfluss auf das natürliche Immunsystem. Der MHC der Ratte, der RT1-Komplex, enthält über 120 funktionelle Gene sowie zusätzlich mehr als 50 Mitglieder der Klasse-I-Multigenfamilie. Zur Charakterisierung der Expression dieser Gene wurde ein MHC-Gen-Mikroarray etabliert, der u.a. zur Analyse der „Graft-versus-Host-Disease“ in einem Rattenmodell verwendet wird.

Im MHC befinden sich auch drei Hitzeschockprotein (HSP) 70-Gene, die u.a. tumorimmunologische Funktionen haben. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass bestimmte Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und der Aktivierung des natürlichen Immunsystems spielen. Wir haben die Auswirkungen einer HSP70-Überexpression in Tumorzellen untersucht. Hier zeigte sich eine aktivierende Wirkung des aus Tumorzellen freigesetzten HSP70 auf die NK-Zell-Aktivität, die gegen solche Tumorzellen gerichtet ist, die Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D exprimieren. Weiterhin wird die Rolle von Polymorphismen in HSP70-Rezeptorgenen sowie in NKG2D-Liganden für die immunologischen Funktionen von HSP70 untersucht. Im Rahmen von Untersuchungen zur Suszeptibilität von Tumorzellen gegenüber zytotoxischen T Lymphozyten (CTL) wird neben der Funktion von HSP70 auch die Rolle von Heparansulfaten für die Granzymvermittelte Apoptose analysiert. Die Bedeutung verschiedener am vesikulären Transport beteiligter Proteine für die Exozytose zytotoxischer Granula wird in knock-out-Mäusen studiert.

Durch die Entdeckung neuer pluripotenter Stammzellen ist die Möglichkeit der therapeutischen Verwendung von Stammzellen deutlich näher gerückt. Wir haben begonnen, die Immunogenität und die Tumorigenität von pluripotenten Stammzellen, Progenitorzellen und daraus differenzierten Zellen sowie die Suszeptibilität dieser Zellen für zytotoxische Mechanismen des Immunsystems systematisch zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass in immunsupprimierten Ratten nur *in vitro* differenzierte neuronale Zellen nicht aber undifferenzierte embryonale Stammzellen Teratome bildeten. Es stellte sich heraus, dass embryonale Stammzellen im Gegensatz zu den differenzierten Zellen NKG2D-Liganden exprimieren und daher durch NK-Zellen effizient lysiert werden. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob das angeborene Immunsystem zur Kontrolle der Tumorigenität pluripotenter Zellen einen Beitrag leisten kann.

#### 4. Functional Analysis of the MHC and Cellular Cytotoxicity

The Dressel research group deals with the major histocompatibility complex (MHC) and the function of certain MHC-linked genes. Research questions come in particular from the fields of tumour immunology and transplantation immunology. The function and role of cytotoxic cells is in the centre of the interest.

The MHC has a central role in the development of the immune system and in the establishment of an immune response. The so-called class I and class II genes control the antigen-specific adaptive immune response. Certain class I and other genes of the MHC are involved in innate immunity. The rat MHC, the RT1 complex, encodes over 120 functional genes and, in addition, more than 50 members of the class I multigene family. To analyse the expression of these genes, we have established a MHC gene microarray, which is used to determine gene expression in a rat model of graft-versus-host disease.

Within the MHC three heat shock protein (HSP) 70 genes are encoded that play a role in tumour immunity. In recent years, certain heat shock proteins were shown to participate in antigen presentation and in activation of the innate immune system. We studied the effects of HSP70 overexpression in tumour cells. An increase of natural killer (NK) cell activity mediated by HSP70 released from tumour cells has been observed that was directed against tumour cells expressing ligands for the activating NK receptor NKG2D. Furthermore, the role of polymorphisms in HSP70 receptor genes and NKG2D ligands for the immunological functions of HSP70 is being investigated. In the context of analysing susceptibility of tumour cells to cytotoxic T lymphocytes (CTL), the role of HSP70 and heparan sulfates for granzyme-mediated apoptosis is studied. Several proteins taking part in the transport of intracellular vesicles are analysed in knock-out mice with respect to their role in exocytosis of cytotoxic granules.

The discovery of new pluripotent stem cell types has improved the perspectives of using stem cells for therapeutic purposes. We have started to study the immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells, progenitor cells, and differentiated cells and their susceptibility to immunological cytotoxicity. We could show that in immunosuppressed rats only *in vitro* differentiated neuronal cells but not undifferentiated embryonic stem cells formed teratomas. It turned out that embryonic stem cells, in contrast to differentiated cells, express NKG2D ligands and are, therefore, efficiently killed by NK cells. These results lead to the question whether the innate immune system can participate in the control of tumorigenicity of pluripotent stem cells.

##### Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders

PD Dr. med. Ralf Dressel

##### Kooperationen Cooperations

F. Alves, Abt. Hämatologie und Onkologie, Universitätsmedizin Göttingen

H. Bickeböller, Abt. Genetische Epidemiologie, Universitätsmedizin Göttingen

Th. Dierks, Abt. Biochemie I, Universität Bielefeld

B. Eiz-Vesper, Institut für Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

W. Engel, H. Hahn, J. Nolte, Abt. Humangenetik, Universitätsmedizin Göttingen

G. Fischer-von Mollard, Abt. Biochemie III, Universität Bielefeld

K. Guan, G. Hasenfuß, Abt. Kardiologie und Pneumologie, Universitätsmedizin Göttingen

T. Herrmann, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

K. Krieglstein, Abt. Neuroanatomie, Universitätsmedizin Göttingen

T. Kuhlmann, Abt. Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen

A. Mansouri, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen

G. Multhoff, Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Technische Universität München

W. Paulus, Abt. Klinische Neurophysiologie, Universitätsmedizin Göttingen

L. Walter, Deutsches Primatenzentrum, Göttingen

M. Wittmann, Abt. Dermatologie und Allergologie, Medizinische Hochschule Hannover

##### Drittmittelförderung Funding

BMBF, NGFN-2, exploratives Projekt, 2004 - 2007

BMBF, OIGN0819, 2008-2011

DFG, GRK 1034, 2005-2009

DFG, DR 394-2-3, 2005-2007

EU, Marie Curie Research Training Network, TRANS-NET, 2005-2009

##### Ausgewählte Publikationen Selected Publications

Müllenschach E, Walter L, Dressel R (2006) A novel discoidin domain receptor 1 (Ddr1) transcript is expressed in postmeiotic germ cells of the rat testis depending on the major histocompatibility complex haplotype. *Gene*, 372: 53-61.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss GP (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440: 1199-1203.

Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J, Engel W (2006) Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest*, 86: 654-63.

Rölleke U, Flügge G, Plehm S, Schlumbohm C, Armstrong VA, Dressel R, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Fuchs E, Czéh B, Walter L (2006) Differential expression of major histocompatibility complex class I molecules in the brain of a New World monkey, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Neuroimmunol*, 176: 39-50.

Averdam A, Seelke S, Grütznert I, Roos C, Westphal N, Stahl-Hennig C, Muppala V, Schrod A, Saueremann U, Dressel R, Walter L (2007) Genotyping and segregation analyses indicate the presence of only two MIC genes in rhesus macaques. *Immunogenetics*, 59: 247-51.

Elsner L, Muppala V, Gehrman M, Lozano J, Malzahn D, Bickeböller H, Brunner E, Zientkowska M, Herrmann T, Walter L, Alves F, Multhoff G, Dressel R (2007) The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors which express inducible NKG2D ligands. *J Immunol*, 179: 5523-33.

Novota P, Sviland L, Zinöcker S, Stocki P, Balavarcu Y, Bickeböller H, Rolstad B, Wang X, Dickinson A, Dressel R (2008) Correlation of Hsp70-1 and Hsp70-2 gene expression with the degree of graft-versus-host reaction in a rat skin explant model. *Transplantation*, 85: 1809-16.

Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Schillert A, Bickeböller H, Herrmann T, Trenkwalder C, Paulus W, Mansouri A (2008) The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and *in vitro* differentiated neuronal precursor cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS ONE*, 3(7): e2622.

Kanwar N, Fayyazi A, Backofen B, Nitsche M, Dressel R, Fischer von Mollard G (2008) Thymic alterations in mice deficient for the SNARE protein VAMP8/endobrevin. *Cell Tissue Res*, 334: 227-42.

Schulz R, Vogel T, Dressel R, Krieglstein K (2008) The TGF- $\beta$  superfamily members, ActivinA and TGF- $\beta$ 1, induce apoptosis in oligodendrocytes by different pathways. *Cell Tissue Res*, 334: 327-38.

#### 5. Effektormechanismen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität

*Alpha- und Beta-Defensine induzieren Chemotaxis von Makrophagen unabhängig von CCR6 und sind potente Mediatoren der angeborenen Immunität*

$\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine repräsentieren zwei unabhängige Subgruppen antimikrobieller Peptide, die in Granulozyten und Epithelien ex-

primiert werden. Sie tragen zur Immunabwehr bei, indem sie die Zellmembran von Mikroorganismen zerstören. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass sich  $\alpha$ - ebenso wie  $\beta$ -Defensine untereinander vollständig desensibilisieren, während die heterologe Desensibilisierung zwischen den beiden Defensin-Subgruppen nur inkomplett und Proteinkinase-C-abhängig ist. Diese Ergebnisse sprechen für das Vorliegen je eines Rezeptors für  $\alpha$ - bzw. für  $\beta$ -Defensine. Im Gegensatz zu früheren Berichten anderer Arbeitsgruppen fanden wir keinerlei Hinweise auf eine Interaktion zwischen  $\beta$ -Defensinen und CCR6.

#### ***IL-4 übt eine breite und potente Wirkung auf die chemotaktische Anlockung dendritischer Zellen und Makrophagen aus***

IL-4 ist als Modulator der Funktionen dendritischer Zellen und Makrophagen bekannt. Wir konnten bereits zeigen, dass IL-4 die Wanderung humaner und muriner dendritischer Zellen sowie Makrophagen nach Anaphylatoxin C5a Gabe in vivo inhibiert. Unsere jüngsten Arbeiten untersuchten den Einfluss von IL-4 und IL-13 auf die Mobilisierung dendritischer Zellen und Makrophagen durch inflammatorische Chemokine und bakterielle Tripeptide wie fMLP. Diese Arbeiten belegen, dass insbesondere IL-4 breite und potente inhibitorische Effekte auf die chemotaktische Mobilisierung dendritischer Zellen und Makrophagen ausübt. Dieser Befund könnte die Grundlage für einen therapeutischen Einsatz von IL-4 als anti-inflammatorisches Medikament bei autoimmunen Erkrankungen legen.

#### ***Das Anaphylatoxin C5a ist ein Chemotaxin für aktivierte Mastzellen***

Mastzellen sind gewebebeständige Zellen mit wichtigen Funktionen bei Allergie und Entzündung. Wir konnten zeigen, dass murine Mastzelltypen signifikante Mengen von C5a Rezeptor nur nach Stimulierung mit dem Kalziumionophor Ionomycin, dem Proteinkinase C Aktivator Phorbolmyristatacetat (PMA) oder mit IgE plus Antigen exprimieren. Mastzellen, die mit Ionomycin, PMA oder IgE plus Antigen stimuliert wurden, aber nicht unstimulierte Zellen, konnten durch C5a in vivo angelockt werden. Unsere Beobachtungen identifizieren somit die Hochregulation von C5aR auf Mastzellen durch IgE-abhängige und unabhängige Mechanismen als eine neuartige regulatorische Funktion der Mastzellen, die den pro-allergischen und pro-inflammatorischen Einfluss des Anaphylatoxins C5a erheblich amplifiziert.

## **5. Effector Mechanisms at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity**

### ***Alpha- and beta-defensins, inducing chemotaxis of macrophages independent of CCR6, are potent mediators of innate immunity***

$\alpha$ - and  $\beta$ -defensins represent two distinct subgroups of antimicrobial peptides expressed by granulocytes and epithelial surfaces. They contribute to host defence by disrupting the cytoplasmic membrane of microorganisms. Our studies show that  $\alpha$ - as well as  $\beta$ -defensins completely desensitize each other's chemotactic activities whereas

heterologous desensitization between members of both defensin subgroups was incomplete and protein kinase C-dependent. These results suggest the presence of distinct receptors for each defensin subgroup. In contrast to previous published reports, we did not find evidence for an interaction between  $\beta$ -defensins and CCR6.

### ***IL-4 exerts broad and potent inhibitory effects on the chemotactic mobilization of dendritic cells and macrophages***

IL-4 is well recognized as a modulator of dendritic cell and macrophage activation. We have previously shown that IL-4 inhibits migration of human and murine dendritic cells and macrophages in response to anaphylatoxins in vivo. In our recent studies, we have examined the influence of IL-4 and IL-13 on the mobilization of dendritic cells and macrophages by inflammatory chemokines and bacteria-derived fMLP. Our results demonstrate that IL-4, and to a lesser degree IL-13, exerts broad and potent inhibitory effects on the chemotactic mobilization of dendritic cells and macrophages, a finding which could provide a strong rationale for the therapeutic use of IL-4 as an anti-inflammatory drug in autoimmune diseases.

### ***Anaphylatoxin C5a is a chemoattractant for activated mast cells***

Mast cells are tissue-resident cells with important functions in allergy and inflammation. We have shown that murine mast cells express significant amounts of anaphylatoxin C5a receptor (C5aR) only after stimulation with calcium ionophore, ionomycin, or with protein kinase C activator, phorbol myristate acetate (PMA), or with IgE plus antigen. Mast cells stimulated with ionomycin, PMA, or IgE plus antigen but not unstimulated cells, were mobilized by C5a in vivo. Our observations identify upregulation of C5aR on mast cells by IgE-dependent and independent mechanisms as a novel regulatory function which strongly amplifies the pro-allergic and pro-inflammatory impact of anaphylatoxin C5a.

#### **Arbeitsgruppenleiter/innen Group Leaders**

PD Dr. Afsaneh Soruri

Prof. Dr. Jörg Zwierner

#### **Kooperationen Cooperations**

J.E. Gessner, Abt. für Klinische Immunologie, Medizinische Hochschule Hannover

T. Werfel, Dermatologische Universitäts-Klinik, Medizinische Hochschule Hannover

J. Köhl, Institut für Immunologie, Universität von Cincinnati, USA

A. Fayyazi, Abt. Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen

U. Lippert, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen

U. Forssmann, Institut für Peptidforschung, Hannover

#### **Drittmittelförderung Funding**

DFG, SO 478/1-1, 2003-2006

DFG, SO 478/1-2, 2006-2007

DFG, ZW 38/4-3, 2005-2006

#### **Ausgewählte Publikationen Selected Publications**

Lee H, Zahra D, Vogelzang A, Newton R, Thatcher J, Quan A, So T, Zwierner J, Koentgen F, Padkjaer SB, Mackay F, Whitfeld PL, Mackay CR (2006) Human C5aR knock-in mice facilitate the production and assessment of anti-inflammatory monoclonal antibodies. NATURE BIOTECHNOLOGY, 24(10): 1279-84.

Köhl J, Baelder R, Lewkowich IP, Pandey MK, Hawlisch H, Wang L, Best J, Herman NS, Sproles AA, Zwierner J, Whitsett JA, Gerard C, Sfyroera G, Lambris JD, Wills-Karp M (2006) A regulatory role for the C5a anaphylatoxin in type 2 immunity in asthma. J CLIN INVEST, 116(3): 783-96.

Kumar V, Ali SR, Konrad S, Zwirner J, Verbeek JS, Schmidt RE, Gessner JE (2006) Cell-derived anaphylatoxins as key mediators of antibody-dependent type II autoimmunity in mice. *J CLIN INVEST*, 116(2): 512-20.

Rahpeymai Y, Hietala MA, Wilhelmsson U, Fotheringham A, Davies I, Nilsson AK, Zwirner J, Wetsel RA, Gerard C, Pekny M, Pekna M (2006) Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis. *EMBO J*, 25(6): 1364-74.

Purwar R, Wittmann M, Zwirner J, Oppermann M, Kracht M, Dittrich-Breiholz O, Gutzmer R, Werfel T (2006) Induction of C3 and CCL2 by C3a in keratinocytes: a novel autocrine amplification loop of inflammatory skin reactions. *J IMMUNOL*, 177(7): 4444-50.

Kassiotis G, Gray D, Kiafard Z, Zwirner J, Stockinger B (2006) Functional specialization of memory Th cells revealed by expression of integrin CD49b. *J IMMUNOL*, 177(2): 968-75.

Zwirner J (2007) C5a receptor expression in T lymphocytes. *J LEUKOCYTE BIOL.*, 81(5): 1159.

Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) Beta-defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *EUR J IMMUNOL*, 37(9): 2474-86.

Grigat J, Soruri A, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J (2007) Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J IMMUNOL*, 179(6): 3958-65.

Ritter U, Lechner A, Scharl K, Kiafard Z, Zwirner J, Körner H (2008) TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of Leishmania major infection. *MED MICROBIOL IMMUN*, 197(1): 29-37.

Jäger JC, Dipl.-Biol., Analyse neuer Regulationsmechanismen des Latenten Membranproteins 2A des Epstein-Barr Virus in B-Lymphozyten. Diplomarbeit Universität Göttingen 2008.

Li X, Dipl.-Biol., Analysis of activity of SH2 domain-containing Inositol Phosphatase (SHIP) induced by B-cell antigen receptor (BCR). Diplomarbeit Universität Göttingen 2008.

Weigel I, Dipl.-Biol., Studien zur Signalleitung in antigeninduzierten B-Zellen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Domänen des Adapterproteins SLP-65. Diplomarbeit Universität Göttingen 2008.

Andresen K, Dipl.-Biol., Untersuchungen zur Auswirkung der verschiedenen SLP-65-Isoformen auf die Signalleitung in B-Zellen. Diplomarbeit Universität Göttingen 2007.

Lösing M, Dipl.-Biol., Funktionelle Untersuchung des cytosolischen Adaptorproteins downstream of kinase-3 in B-Zellen. Diplomarbeit Universität Göttingen 2007.

Schläger C, Dipl.-Biol., Etablierung und Anwendung eines Antikörper-unabhängigen Internalisierungs- und Rezyklisierungstests für den CC Chemokinrezeptor. Diplomarbeit Universität Göttingen 2007.

Alers S, Dipl.-Biol., The non-T cell activation linker NTAL affects phospholipase C-gamma2 plasma membrane recruitment in B lymphocytes. Diplomarbeit Universität Bielefeld 2006.

Allner K, Dipl.-Biol., Post-endozytische Sortierungsmechanismen des Chemokinrezeptors CCR5. Diplomarbeit Universität Göttingen 2006.

Barthel K, Dipl.-Biol., Nachweis der Expression von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf Immunzellen mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Diplomarbeit Universität Göttingen 2006.

Brechmann M, Dipl.-Biol., Reconstitution studies on the functional interplay of Syk and SLP-65 in lymphocyte activation. Diplomarbeit Universität Bielefeld 2006.

Dittmann S, Dipl.-Biol., In vivo Analyse des Cytoskeletts in Primärzellen von wildtypischen und mAbp1-defizienten Mäusen. Diplomarbeit Universität Bielefeld 2006.

Emmerich C, Dipl.-Biol., Etablierung eines Modellsystems zur Analyse von Signalleitungsmechanismen des Epstein-Barr-Virus-codierten Latenten Membranproteins 2A. Diplomarbeit Universität Bielefeld 2006.

Polaschegg C, Dipl.-Biol., Rekonstitutionsexperimente zur Identifizierung funktioneller Wechselwirkungen zwischen den B-Zell-Signalelementen Syk und SLP-65. Diplomarbeit Universität Bielefeld 2006.

Bremes V (2008) Phosphorylation-dependent regulation of Lyn tyrosine kinase in inhibitory and activating BCR signaling. Universität Göttingen, MSc.

## **Mitgliedschaften und Mitarbeit in wissenschaftlichen Gremien und Kommissionen** Memberships and Activities in Scientific Boards and Committees

**Prof. Dr. Martin Oppermann**

Assoc. Editor, Life Sciences, Elsevier

**Prof. Dr. Holger Reichardt**

Deutsche Gesellschaft für Immunologie

**Prof. Dr. Jürgen Wienands**

Beirat, Deutsche Gesellschaft für Immunologie

Beirat, Gesellschaft für Signaltransduktion

Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

## **Universitäre Gremien** University Boards

**PD Dr. Ralf Dressel**

Mitglied des Vorstandes, Zentrum Hygiene und Humangenetik, 2003-2006

**Prof. Dr. Martin Oppermann**

Erasmus-Programmbeauftragter für die Medizinische Fakultät

Promotionskommission, stellv. Promotor

Qualitätsbeauftragter für die Lehre

**Prof. Dr. Holger M. Reichardt**

Kommission für das Hochschuleigene Auswahlverfahren

**Prof. Dr. Jürgen Wienands**

Habilitationskommission

Planungsausschuss Promotionskolleg GAUSS, Jacob-Henle-Programm (Sprecher)

Zentrale Kommission für Lehre und Studium

## **Anhang Appendix**

### **Medizinische Dissertationen (Dr. med.; Dr. med. dent.)**

#### **Doctorate Theses (Dr. med.; Dr. med. dent.)**

Bley A, Dr. med., Untersuchung des C3a-Rezeptors des Menschen und der Ratte mittels neuer monoklonaler Antikörper. Dissertation Universität Göttingen 2008.

Griep S, Dr. med., Funktionelle Analyse des zytoplasmatischen mlgE-Anteils im Rahmen der B-Zell-Antigen-Rezeptor-Signalleitung. Dissertation Universität Göttingen 2008.

Zimmermann J, Dr. med., Verstärkung der Immunstimulation dendritischer Zellen mit Hilfe synthetischer Mikropartikel zur Verbesserung zellulärer Vakzine. Dissertation Universität Göttingen 2007.

Gangl S, Dr. med., In-vitro-Generierung von zytotoxischen T-Zellen gegen menschliche, das Onkoprotein HDM2 überexprimierende Melanomzellen. Dissertation Universität Göttingen 2006.

Wilken-Tergau H, Dr. med., Untersuchungen zur Aktivität des Anaphylatoxinkataboliten C3a(des Arg) - Rekombinante Herstellung in E.coli-Bakterien und Entwicklung einer Methode zur Detektion von Rezeptor-Ligand-Bindungen im Durchflußzytometer. Dissertation Universität Göttingen 2006.

Yu S, Dr. med., Charakterisierung immunologischer Eigenschaften von PA6-Zellen. Dissertation Universität Göttingen 2006.

### **Naturwissenschaftliche und andere Dissertationen (Dr. rer. nat. und andere)**

#### **Doctorate Theses (Dr. rer. nat. and others)**

Muppala VK, Dr. rer. nat., Polymorphisms of heat shock protein receptors. Dissertation Universität Göttingen 2008.

Yigit G, Dr. rer. nat., Regulation von B-Zell-Signalprozessen durch das Latente Membranprotein 2A des Epstein-Barr-Virus. Dissertation Universität Bielefeld 2008.

Dittmann K, Dr. rer. nat., Der Hedgehog-Rezeptor Patched als molekularer Schalter der Hämatopoese. Dissertation Universität Bielefeld 2007.

Goldbeck I, Dr. rer. nat., Studien zur subzellulären Navigation von Signalmolekülen der Ca<sup>2+</sup>-Antwort in aktivierten B-Lymphocyten. Dissertation Universität Bielefeld 2007.

Tischner D, Dr. rer. nat., Mechanistische Untersuchungen zur Therapie von Multipler Sklerose am Beispiel der Experimentellen Autoimmunen Encephalomyelitis. Dissertation Universität Würzburg 2007.

Stork B, Dr. rer. nat., A molecular basis for differential Ca<sup>2+</sup> signalling in B lymphocytes. Dissertation Universität Bielefeld 2006.

Wienand S, Dr. rer. nat., Die mAbp1-defiziente Maus: ein Modellsystem für kardiale und neuronale Erkrankungen. Dissertation Universität Bielefeld 2006.

### **Diplom- und Masterarbeiten** Diploma and Master Theses

Gorges T, Dipl.-Biol., Funktionelle Untersuchung des cytosolischen Adapterproteins downstream of kinase-3 in B-Zellen. Diplomarbeit Universität Göttingen 2008.

Heemann C, Dipl.-Biol., Analyse spezifischer Signalmechanismen des mlgE-B-Zell-Antigenrezeptors. Diplomarbeit Universität Göttingen 2008.

### **Fachgutachtertätigkeit** Function as Expert Consultant

#### **PD Dr. Ralf Dressel**

Cancer Research UK, Deutsche Forschungsgemeinschaft; Europäische Union, Gesellschaft für AIDS-Forschung e.V.; University of Chester, UK; verschiedene Fachzeitschriften (z.B. J Immunol, Cancer Res)

#### **Prof. Dr. Martin Oppermann**

Deutsche Forschungsgemeinschaft; Österreichische Akademie der Wissenschaften; Research Council Hong Kong

#### **Prof. Dr. Holger M. Reichardt**

Deutsche Forschungsgemeinschaft, The Netherlands Organization for Scientific Research, Ligue Française contre la Sclérose en Plaque, Tiroler Wissenschaftsfonds, Medical Research Scotland; Gutachterliche Tätigkeit im Rahmen von Habilitationen und Berufungen im In- und Ausland sowie für zahlreiche Fachzeitschriften (z.B. Nature Medicine, Blood, Journal of Immunology)

#### **Prof. Dr. Jürgen Wienands**

Deutsche Forschungsgemeinschaft; Österreichischer Nationalfonds; Alexander von Humboldt Stiftung; Boehringer Ingelheim Fonds; Fachzeitschriften

### **Internationale wissenschaftliche Kooperationen**

#### **International Scientific Cooperations**

#### **PD Dr. Ralf Dressel**

A.M. Dickinson, School of Clinical and Laboratory Sciences, University of Newcastle, UK

B. Rolstadt, Department of Anatomy, University of Oslo, Norwegen

#### **Prof. Dr. Martin Oppermann**

A. Edwards, Mayo Clinic, Rochester/MN, USA.

H. Miettinen, Montana State University, Bozeman/MT, USA

#### **Prof. Dr. Holger Reichardt**

D. Furlow, University of California Davis, USA

A. Louw, University of Stellenbosch, Südafrika

J. Taurog, University of Dallas, USA

A. Villunger, Universität Innsbruck, Österreich

#### **Prof. Dr. Jürgen Wienands**

F. Batista, London Research Institute, London

T. Kurosaki, RIKEN-Institut, Yokohama, Japan

O. Rocks, Mount Sinai Hospital, Toronto

T. Tsubata, Medical and Dental University, Tokio, Japan

E. Vigorito, Babraham Institute, Cambridge, UK

D. Yablonski, Rappaport Faculty of Medicine, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

### **Fakultätsinterne Förderung** Internal Faculty Funding

Anschubfinanzierung, Forschungsförderungsprogramm 2007, „Analyse und Manipulation mlgE-spezifischer Signalmechanismen in vivo“ (Niklas Engels)

Startförderung, Forschungsförderungsprogramm 2008, „In vivo Untersuchung der Regulation von antigen-induzierten Signalen in B-Lymphozyten durch die SH2 domain-containing inositol phosphatase (SHIP)“ (Michael Engelke)

### **EU-Projekte** European Research Projects

TRANS-NET, MRTN-CT-2004-512253, 2005-2009

EURO-PADnet, HEALTH-F2-2008-201549, 2008-2011

(NEST)HYBLIB, 012919, 2005-2009

### **Stipendiaten/Stipendiantinnen** Scholarship Holders

Vijayakumar Muppala, DFG - GRK 1034, 05/2005-04/2008

Sara Y. Demiroglu, DFG - GRK 1034, 01/2008-05/2009

### **Gastwissenschaftler/innen** Guest Scientists

Laura Hecker, Mayo Clinic, Rochester/MN, USA, 20.8.-21.9.2008

Elena Vigorito, Babraham Institute, Cambridge, Großbritannien, 11.-20.11.2008

### **Firmenkooperationen** Industrial Cooperations

Hycult Biotechnology, Uden, Niederlande

Novartis Research Institute, Basel, Schweiz

N.V. Organon, Oss, Niederlande

OMT Inc., Palo Alto, USA

TaconicArtemis GmbH, Köln

### **Schutzrechte, Patente** Intellectual Property Rights

R. Dressel, L. Elsner: Compositions and methods for immunotherapy, 2007, PCT/EP2007/009857

### **Vorhandene forschungsrelevante Großgeräte**

#### **Specialised Research Equipment**

Durchflusszytometer FACS CANTO II (Becton Dickinson)

Durchflusszytometer FACS LSR II (Becton Dickinson)